

Presencia de antraquinonas en diferentes partes de la planta de *Morinda citrifolia* L.

Maribel Rivas (1), Janetsy Borroto (1), María A. Blanco (1), Martha Hernández (1), Reinaldo Trujillo (1) y Oscar Concepción Laffite (2)

(1) Lab. de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila.

(2) Lab. de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila.

RESUMEN. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de antraquinonas en diferentes partes de la planta *Morinda citrifolia* L. En el análisis cualitativo se determinó la presencia de las antraquinonas en las raíces y tallos. Del análisis cuantitativo se obtuvo que el mayor contenido de antraquinonas se determinó en las raíces, difiriendo significativamente del resto. En la purificación por columnas de sílica gel se observó en las raíces un pico entre las fracciones de la 5 a la 15 (gradientes 2 y 3). En los tallos, sólo en el gradiente 2 aparece un pico de gran intensidad. Para las ramas, se observaron dos picos insignificantes que absorbieron en los mismos gradientes 2 y 3 que las raíces, coincidiendo con la polaridad de los compuestos en este órgano. Las hojas presentaron un mayor número de compuestos y de variada polaridad, entre los gradientes 2 y 4. En los frutos, aunque se observan dos compuestos bien definidos en los gradientes 2 y 3, sus intensidades son bajas. Los resultados de la TLC están en correspondencia con los obtenidos en columna, ya que solamente en los gradientes 2 y 3 aparecen los picos de mayores intensidades. En orden decreciente le sigue el tallo y no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos en las ramas, hojas y frutos.

Palabras clave: Antraquinonas, *Morinda citrifolia* L., extracción, purificación.

ABSTRACT. This paper's objective is to determine the presence of anthraquinones in different parts of the *Morinda citrifolia* L plant. It was determined the presence of anthraquinones in the roots and stems in the qualitative analysis. From the quantitative analysis it was obtained that the greater content of anthraquinones was found in the roots, differing significantly from the rest. In the purification by silica gel columns a peak from fraction 5 to 15 was observed in the roots (gradients 2 and 3), in the stems, only in gradient 2 appears a peak of big intensity. For the branches, two insignificant peaks that absorbed in the same gradients 2 and 3 like the roots did, were observed, agreeing with the polarity of compounds in this organ. The leaves presented a greater number of compound and varied polarity, from gradients 2 to 4. Although we observed in fruits two well defined compounds in the gradients 2 and 3, their intensities are low. The results of the TLC correspond to the column ones, since only gradients 2 and 3 have the most intense peaks. In decreasing order it follows the stem and we did not find significant differences among the results in the branches, leaves and fruits.

Key words: Anthraquinones, *Morinda citrifolia* L., extraction, purification.

INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores producen un gran número de metabolitos secundarios (Hostettmann y Terreaux, 2000; Rates, 2001). La literatura informa dos principales caminos biosintéticos que conducen a las antraquinonas en las plantas superiores (Han *et al.*, 2001): la vía de los policétidos y la del corismato/ácido o-succinilbenzoico. Esta última vía es la que está presente en las Rubiaceas donde se ha demostrado que el anillo C de las antraquinonas proviene a partir de la vía del 2-C-metil-D eritritol-

4-fosfato y no a partir del mevalonato. El proceso exacto de síntesis de antraquinonas dentro de las células no es conocido hasta ahora (Han *et al.*, 2001).

Las antraquinonas obtenidas a partir de plantas de la familia *Rubiaceae* muestran algunas actividades biológicas: anti-microbial (Sittie *et al.*, 1999), anti-fungal (Rath *et al.*, 1995); hipotensivo, analgésico (Younos *et al.*, 1990); anti-malarial (Koumaglo *et al.*, 1992); antioxidante (Tripathi *et al.*, 1997);

función anti-leucémica y mutagénico (Chang y Chen, 1995; Ismail *et al.*, 1997).

El objetivo del trabajo fue determinar la posible presencia de antraquinonas en diferentes partes de la planta de *Morinda citrifolia* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: se utilizaron hojas, ramas, raíces, tallos y frutos de plantas adultas de *Morinda citrifolia* L. del área experimental de aclimatización en el Centro de Bioplantas.

Análisis cualitativo: el análisis cualitativo de antraquinonas, se realizó mediante la Reacción de Borntraeger. Una coloración roja en la fase acuosa indica presencia de antraquinonas.

Análisis cuantitativo: para el análisis cuantitativo se partió de las diferentes partes de la planta (hojas, ramas, inflorescencia, frutos y raíces) se utilizó el procedimiento de extracción descrito por Han *et al.* (2001) y la cuantificación se determinó a 434 nm para el coeficiente de extinción molar de 55 000 de la alizarina de acuerdo a Schulte *et al.* (1984). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la raíz y por ser el órgano que acumula la mayor presencia de antraquinonas, se procedió a analizar los extractos de acuerdo a la técnica descrita por Nor Hadiani *et al.* (1997).

Extracción: para la extracción de las raíces se tomaron 20 g y se les añadió 200 mL de diclorometano (DCM) luego se colocaron en la oscuridad en un cuarto de temperatura por 96 h. El solvente se removió a presión reducida dejando unos cristales de color amarillo- naranja.

Análisis cromatográfico (Purificación): el extracto crudo se redisolvió en éter de petróleo de 65-90° y se aplicó a una columna (2 cm x 10 cm) empacada con sílica gel lavada en ácido (previamente agitada con 4 % de ácido oxálico durante 30 min, filtrada y secada a 90°). La columna se eluyó por pasos con éter de petróleo, DCM y DCM enriquecido con cantidades crecientes en porcentajes de metanol (MeOH) (1, 2, 5 y 10 %).

Para cada paso se recogieron cinco fracciones de 2 mL cada una.

Cromatografía en capa fina (TLC): la cromatografía en placa fina se llevó a cabo en sílica gel 60 (Merck). Las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna se rotoevaporaron a sequedad y el residuo se redisolvió en MeOH. El remanente insoluble se disolvió en DCM. La fase móvil consistió en una mezcla cloroformo:metanol 99:1.

Revelado: se realizó con NaOH 10 % (una coloración roja indica presencia de antraquinonas). Se calculó el Rf para todos los compuestos separados en las distintas fracciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cualitativo

La figura 1 muestra los resultados del análisis cualitativo de antraquinonas mediante la Reacción de Borntraeger. Como se aprecia (de izquierda a derecha), en la raíz y el tallo se hace evidente la presencia de estos compuestos, y no se observa reacción positiva en las ramas, hojas y frutos, cuya coloración es amarilla. Sin embargo, el hecho de no dar reacción positiva al reactivo de Borntraeger no permite asegurar la no presencia de estos compuestos, ya que pueden encontrarse en forma libre lo que se detecta con acetato de magnesio al 0,5 % y cuyo ensayo no se realizó (Véase figura 1).

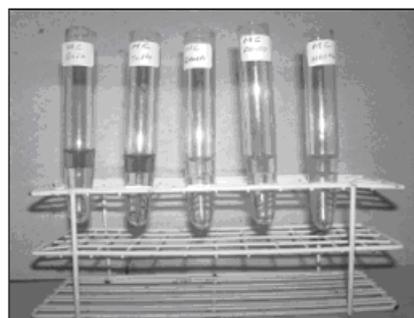


Figura 1. Reacción de Borntraeger en diferentes partes de la planta para la detección de antraquinonas libres. De izquierda a derecha: raíz, tallo, rama, frutos y hojas

Cuantificación

La figura 2 (a, b) muestra el espectro de absorción en el UV-visible (a) de los extractos de las distintas partes de la planta de *Morinda citrifolia* L. analizados y el análisis cuantitativo (b).

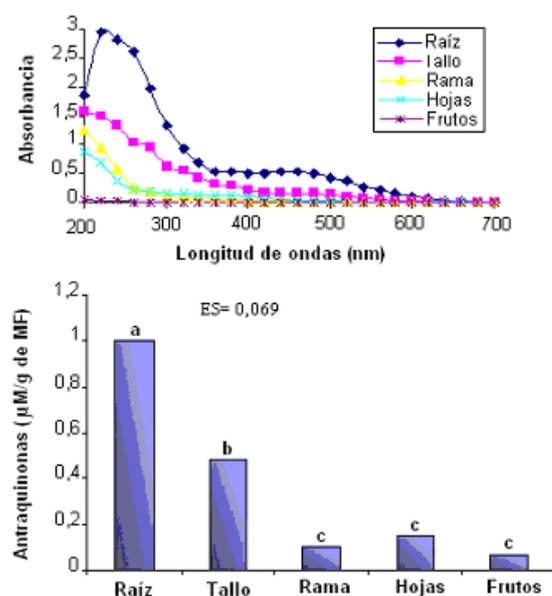


Figura 2 (a y b). a) Espectros de absorción UV-visible, b) Análisis cuantitativo de diferentes partes de la planta de *Morinda citrifolia* L.

En el caso de la raíz se observan dos máximos de absorción a 220 nm y 440 nm, mientras que en el tallo entre 200-280 nm, y menos marcado que para la raíz. En el resto de las partes, ramas y hojas, los valores más altos se encontraron a 200 nm. No se muestran máximos de absorción. Del análisis cuantitativo se deriva que las raíces son las de mayor contenido de antraquinonas en las diferentes partes de la planta, difiriendo significativamente del resto. En orden decreciente le sigue el tallo y no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos en las ramas, hojas y frutos. Estos resultados están en correspondencia con los espectros de absorción observados.

Los resultados obtenidos en este análisis se corroboran con los informados en la literatura (Ramos *et al.*, 1998; Hans *et al.*, 2001, 2002), los que plantean que la raíz es el órgano de mayor acumulación de antraquinonas.

Cromatografía en columna de sílica gel activada

En la figura 3 (a, b, c, d y e), aparece el perfil cromatográfico obtenido al purificar extractos crudos de las raíces (a), tallos (b), ramas (c), hojas (d) y frutos (e) de *Morinda citrifolia* L. por columnas de sílica. Las primeras cinco fracciones se colectaron después de pasar 10 mL de éter de petróleo (65-90°) y las siguientes fracciones (5-30) se eluyeron con diferentes gradientes de DCM y DCM-Metanol (1, 2, 5 y 10 %). En las raíces (figura 3a) se observa un pico entre las fracciones de la 5 a la 15 (G2: DCM y G3: DCM-MeOH 1 %), lo que demuestra el carácter no polar o medianamente polar de los compuestos presentes en el extracto. En el caso de los tallos (figura 3b), sólo en el gradiente dos (DCM) aparece un pico de gran intensidad, demostrando el carácter no polar de los compuestos. Para las ramas (figura 3c) se observan dos picos insignificantes que absorben en los mismos gradientes dos y tres que las raíces, coincidiendo con la polaridad de los compuestos en este órgano. Las hojas (figura 3d) presentaron un mayor número de compuestos y de variada polaridad, ya que se detectaron compuestos desde el gradiente dos (DCM) hasta el cuatro (DCM-MeOH 2 %). Estas intensidades, aunque son mayores que en la rama, no alcanzan a las presentadas por los compuestos presentes en raíces y tallos. En los frutos (figura 3e), el perfil cromatográfico aunque se observan dos compuestos bien definidos en los gradientes dos (DCM) y tres (DCM-MeOH 1 %), sus intensidades son bajas.

Al analizar estos perfiles integralmente, y teniendo en cuenta los resultados del ensayo cualitativo, podemos decir que en las raíces y tallos predominan compuestos similares a las antraquinonas o sus derivados, en cambio, en el resto de los órganos la absorbancia a 430 nm pudiera estar relacionada con otros metabolitos secundarios presentes en los extractos. Pólit *et al.* (2004), informa perfiles de metabolitos secundarios bien distintos para las hojas y las raíces. Sin embargo, vismionas, biantronas y antraquinonas están químicamente relacionados a partir de un punto de vista biogénico (Botta *et al.*, 1985) y puede ocurrir biotransformación durante el proceso.

Cromatografía por TLC

Los resultados de la cromatografía en placa fina (TLC) de las distintas fracciones con los valores de

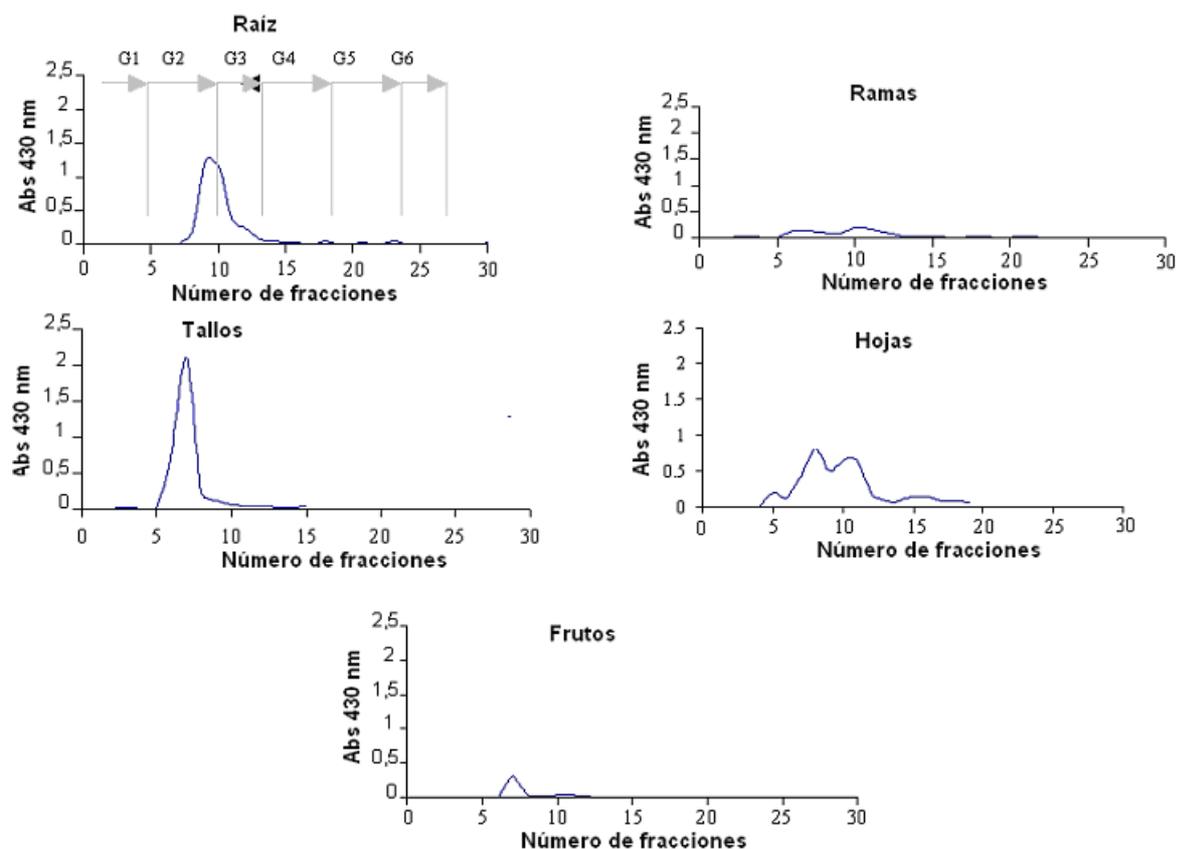


Figura 3 (a,b,c,d,e). Perfil cromatográfico de la purificación en columnas de sílica gel activada en ácido de extractos crudos: a) raíz, b) tallo, c) ramas, d) hojas y e) frutos de *Morinda citrifolia* L. La columna se eluyó en etapas con diferentes gradientes de polaridad de los solventes: G1: éter de petróleo, G2: DCM, G3: DCM + MeOH 1 %, G4: DCM + MeOH 2 %, G5: DCM + MeOH 5 % y G6: DCM + MeOH 10

Tabla 1. Cromatografía en placa fina (TLC) de las diferentes partes de la planta de *Morinda citrifolia* L., para cada una de las fracciones analizadas en la cromatografía en columna, donde se expresa el valor del Rf (color de la mancha en la placa), antes del revelado

Parte	Rf	Fracción I	Fracción II	Fracción III	Fracción IV
Raíz	Rf ₁	-	0,2 (Fresa)	0,2 (Fresa)	-
	Rf ₂	-	0,5 (Fresa)	0,5 (Fresa)	-
	Rf ₃	-	1,5 (Naranja)	2,0 (Amarillo)	-
	Rf ₄	-	-	2,3 (Naranja)	2,3 (Naranja)
	Rf ₅	-	3,3 (Amarillo)	-	-
	Rf ₆	-	3,6 (Naranja)	-	-
	Rf ₇	-	4,6 (Amarillo)	-	-
Tallo	Rf ₁	-	0,2 (Fresa)	-	-
	Rf ₂	-	0,4 (Fresa)	-	-
	Rf ₃	-	0,75 (Amarillo)	-	-
	Rf ₄	-	0,96 (Naranja)	-	-
Rama	Rf ₁	-	0,34 (Fresa)	-	-
	Rf ₂	-	0,64 (Amarillo)	-	-
	Rf ₃	-	0,87 (Amarillo)	-	-
Fruto	Rf ₁	-	-	0,42 (Naranja)	-
	Rf ₂	-	0,55 (Naranja)	-	-
Hoja	Rf	-	-	-	-

Rf y el color de las manchas se muestran en la tabla 1.

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en columna, ya que solamente en las fracciones dos (DCM) y tres (DCM-MeOH 1 %) aparecen los picos de mayores intensidades. La raíz es la parte de la planta que mostró mayor cantidad de compuestos seguidas por el tallo y las ramas. La diversidad de colores indica la presencia de diferentes compuestos, quizás de similar naturaleza (isoprenoides).

De los resultados se puede inferir la presencia de antraquinonas, pero se requieren de estudios posteriores para llegar a su identificación

BIBLIOGRAFÍA

Botta, B.; F. Delle Monache; G. Delle Monache; G. B. Marini; J. U. Oguakwa (1985): "Prenylated bianthrone and vismione F from *Psorospermum febrifugum*". *Phytochemistry* (24): 827-830.

Chang P. and C. Chen (1995): "Isolation and characterization of antitumor anthraquinones from *Morinda umbellata*". *Chin Pharm. J.* (Taipei) (47): 347-353.

Han Ying-Shan; R. van der Heijden; R. Verpoorte (2001): "Biosíntesis of antraquinones in cell cultures of the Rubiaceae". *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* (67): 201-220.

Han Y-S; R. van der Heijden; A. W.M. Lefeber *et al.* (2002): "Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona* Robusta proceeds via the methylerythritol 4-phosphate pathway". *Phytochemistry* (59): 45-55.

Hostettmann, K. and C. Terreaux (2000): "Search for new lead compounds from higher plants". *Chimia* (54): 652-657.

Ismail, N. H. ; A. M. Ali ; M.,N. Aimi *et al.*(1997): "Anthraquinone from *Morinda elliptica*". *Phytochemistry* (45): 1723-1725, 1997.

Koumaglo K.; M. Gbeassor; O. Nikabu *et al.* (1992): "Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*". *Planta Med.* (58): 533-534.

Nor Hadiani, IAM.A; N. Aimi; M. Kitajima *et al.* (1997): "Anthraquinones from *Morinda elliptica*". *Phytochemistry* 45 (8): 1723-1725.

Politi, M.; R. Sanogo; K. Ndjoko *et al.* (2004); "HPLC-UV/PAD and HPLC-MS. Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new biantrones". *Phytochemical Anal* (15): 355-364.

Ramos-Valdivia, A. C.; R. Van der Heijden; R. Verpoorte (1998): "Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferase activities in Rubiaceae and Apocynaceae cultures". *Phytochemistry* (48): 961-969.

Rate, S. M. K (2001): "Plants as source of drugs". *Toxicon* 39: 603-613.

Rath G.; M. Ndonzao; K. Hostettmann (1995): "Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*". *Int. J. Pharmacogn.* (33): 107-114.

Schulte, U.; H. El-Shagi; M. H. Zenk (1984): "Optimization of 19 Rubiaceae species in cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*". *Plant Cell Rep.* (3): 51-54.

Sittie A. A.; E. Lemmich; C. E. Olsen *et al.* (1999): "Structure-activity studies: in vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*". *Planta Med.* (65): 259-261.

Tripathi, Y. B.; M. Sharma; M. Manickam (1997): "Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia*". *Ind. J. Biochem Biophys.* (34): 302-306.

Younos, C; A. Rolland; J. Fleurentin *et al.* (1990): "Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*". *Planta Medica* (56): 430-434.

Recibido: 13/12/05

Aceptado: 9/03/06